

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



**Kateřina Vaverová**

**Vliv teploty a vlhkosti kultivačních boxů na metabolismus  
rostlin kostřavy (*Festuca rubra*)**

**The effect of temperature and humidity on metabolism of *Festuca rubra***

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.**

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 14. července 2017

.....

Kateřina Vaverová

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracovávání této práce, hlavně za velikou trpělivost a ochotu se mi věnovat. Dále bych ráda poděkovala své rodině za dlouhodobou podporu, trpělivost a pochopení.

## Abstrakt

Faktory životního prostředí jako je dostupnost vody, živin, teplota a sluneční záření ovlivňují růst a metabolismus rostlin. Populace rostlin kostřavy (*Festuca rubra* L.) ze čtyř stanovišť v Norsku lišících se nadmořskou výškou, průměrnou teplotou a množstvím srážek byly pěstovány v klimatizovaných boxech lišících se teplotou a vlhkostí. Ve vzorcích listů těchto rostlin byla stanovena aktivita Rubisco, aktivita šikimátdehydrogenázy a množství proteinů.

Specifická aktivita Rubisco byla nejnižší v listech rostlin kostřavy pěstované za podmínek sucha a zvýšené teploty, statisticky výrazné rozdíly mezi jednotlivými stanovišti a podmínkami pěstování však nebyly zjištěny. Specifická aktivita šikimátdehydrogenázy byla naopak za podmínek sucha a zvýšené teploty nejvyšší. Izoenzymové složení bylo testováno pomocí nativní elektroforézy.

Klíčová slova: Rubisco, šikimátdehydrogenáza, abiotický stres rostlin

## Abstract

Factors of environment such as availability of water, nutrients, temperature and sunlight affect growth and metabolism of plants. The populations of the *Festuca rubra* L. from four habitats in Norway, differing in altitude, average temperature and precipitation, were grown in climatic boxes differing in temperature and humidity. The Rubisco, shikimate dehydrogenase activity and amount of the protein were determined in the leaf samples of these plants.

The specific activity of Rubisco was the lowest in leaves of *Festuca* plants grown in drought and elevated temperatures, but statistically significant differences between the various habitats and growth conditions were not found. The specific activity of shikimate dehydrogenase was, on the contrary, under drought conditions and elevated temperatures were the highest. The isoenzyme composition was tested by native electrophoresis. (In Czech)

Key words: Rubisco, shikimate dehydrogenase, abiotic stress in plants

# Obsah

1. Úvod.....	8
1.1. Abiotický stres rostlin .....	8
1.2. Stres způsobený nedostatkem vody .....	8
1.2.1. Vodní režim rostliny .....	9
1.2.2. Odpovědi rostlin na stres suchem .....	10
1.3. Teplotní stres .....	13
1.3.1. Stres horkem .....	14
1.3.2. Stres způsobený nízkou teplotou .....	14
1.4. Oxidativní stres .....	16
1.5. Obranné mechanismy umožňující se stresu vyhnout či ho tolerovat.....	18
1.5.1. Trehalosa.....	19
1.5.2. GABA .....	19
1.5.3. Glycin betain.....	19
1.5.4. Prolin.....	20
1.5.5. LEA proteiny .....	21
1.5.6. Heat shock proteiny .....	22
1.6. Kombinace stresových vlivů .....	22
1.7. Záplavy a nedostatek kyslíku .....	23
1.8. Využití poznatků studia v pěstivelní.....	23
2. Cíl práce .....	24
3. Materiál a metody .....	24
3.1. Přístroje .....	24
3.2. Chemikálie .....	24
3.3. Rostlinný materiál .....	25
3.4. Metody .....	27

3.4.1.	Extrakce rostlinného materiálu .....	27
3.4.2.	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda.....	27
3.4.3.	Stanovení aktivity Rubisco .....	27
3.4.4.	Stanovení aktivity šikimátdehydrogenázy .....	28
3.4.5.	Nativní elektroforéza .....	28
4.	Výsledky .....	29
4.1.	Testování aktivity Rubisco v rostlinách kostřavy .....	29
4.2.	Testování aktivity šikimátdehydrogenázy v rostlinách kostřavy .....	30
5.	Diskuze .....	32
6.	Závěr .....	35
7.	Citace .....	37

## Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
ATP	adenosintrifosfát
APX	askorbát peroxidáza
CAT	kataláza
DTT	dithiotreitol
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
g	tíhové zrychlení ( $g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$ )
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GB	glycin betain
GPX	glutathionperoxidáza
GR	glutathion reduktáza
HEPES	4-(-2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
LEA	late embryogenesis abundant proteins, proteiny hojné při pozdní embryogenezi
NADP (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SOD	superoxid dismutáza
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyletylendiamin
Tris	tris-(hydroxymetyl)-aminometan

# 1. Úvod

## 1.1. Abiotický stres rostlin

Rostliny jsou často vystavovány stresu způsobenému životním prostředím, jehož nepříznivé podmínky negativně ovlivňují růst, vývoj či produktivitu. Stres může být biotický, vyvolaný působením jiných organismů, či abiotický, vyvolaný vychýlením z ideálních podmínek fyzikálních vlivů a chemického složení prostředí. Mezi vlivy působící poškození rostliny patří záplava, sucho, vysoká či nízká teplota, nadměrná salinita půdy, neadekvátní minerální výživa a nadmíra či nedostatek světla. Pletiva rostlin mohou rovněž poškodit fytotoxické látky, například ozon [1].

Stres spouští širokou škálu odpovědí rostlin od změn v transkripci a exprese proteinů a buněčného metabolismu po změny rychlosti růstu a výnosu zemědělských plodin. Doba trvání, závažnost a míra stresu ovlivňují odpověď rostliny. Kombinace několika stresových faktorů může vyvolat odlišnou odpověď od působení stresových faktorů jednotlivě. Odpověď může být vyvolána přímo působením stresu (např. chladem) nebo zraněním, které bylo stresem způsobeno (např. porušení membrány ledovými krystalky). Odolnost a citlivost vůči stresu je podmíněna druhem, genotypem, vývojovým stádiem a orgánem či pletivem [1].

Molekulární mechanismy, které tvoří odpovědi na stres rostlin, zahrnují změny v genetické expresi a buněčné signalizační transdukci a hrají důležitou roli při udržování buněčné homeostázy při působení stresu [1].

Jedním z hlavních důvodů studia stresu rostlin je využití získaných znalostí při jejich pěstování. Změny v klimatu způsobují značnou nejistotu v zemědělství. Zemědělskou produkci ovlivňuje počasí, jehož hlavními parametry jsou teplota, sluneční svit a srážky. [2]

Cílem klasických šlechtitelských postupů a nověji biotechnologických metod je získat vyšší odolnost rostlin i jejich produktivitu.

## 1.2. Stres způsobený nedostatkem vody

Ze všech abiotických typů stresu nejvíce ovlivňuje růst a metabolismus rostlin sucho, protože dostupnost vody je nezbytná pro život [2]. Sucho postihuje 45 % pevniny, kde žije 38 % lidské populace [3].



Sucho závisí na mnoha faktorech meteorologických, hydrologických a zemědělských (množství srážek, půdní vlhkost, hladiny nádrží, množství povrchové vody, sněhová pokrývka, hladiny podzemních vod a míra tepelného namáhání). Závažnost sucha je těžko předvídatelná vzhledem k vysokému množství faktorů, jimiž je ovlivněno [4].

Snížená dostupnost vodní vláhly snižuje úrodnost půdy, zvyšuje její erozi a mění koncentraci iontů v půdě. Velmi důležitými faktory jsou doba trvání sucha a vegetační období, ve kterém sucho nastane. Například cibuli sucho ohrožuje na začátku růstu, pozdější dlouhodobá sucha ji už tolik neohrožují [5].

Identifikace fyziologické podstaty odpovědi rostliny na stres je klíčová k cílenému vylepšení rostliny šlechtěním [6].

Rostliny odolné vůči suchu se přizpůsobily buďto udržením stavu vody pletivech, tolerováním snížení obsahu vody v pletivech, či schopností regenerovat se po ukončení stresu [7].

Jednotlivé rostliny se od sebe liší tím, do jaké míry dokáží upravit své schopnosti tolerovat nebo se vyhýbat působení sucha, to jest jak zvládají dynamiku ztráty vody, jaké mají indikátory stavu vody v rostlině a výměny plynů, jaké mají možnosti růstu a expanze listů při nedostatku vody, jaké mají možnosti se osmoticky ochránit vůči dehydrataci, jakou mají plodnost květů a jakou měrou plní zrna při působení sucha. Porovnáváním genomů různých druhů rostlin lze nalézt spojitost hledané funkce s příslušným genem. Lze pak přenést žádanou alelu z odolné rostliny na zemědělsky využívaný druh, např. obilí [3].

### **1.2.1. Vodní režim rostliny**

Stav vody v rostlinách je ovlivňován vodním potenciálem listů, rychlostí transpirace, rezistencí průduchů, teplotou listů a povrchu rostliny a akumulací osmolytů [8].

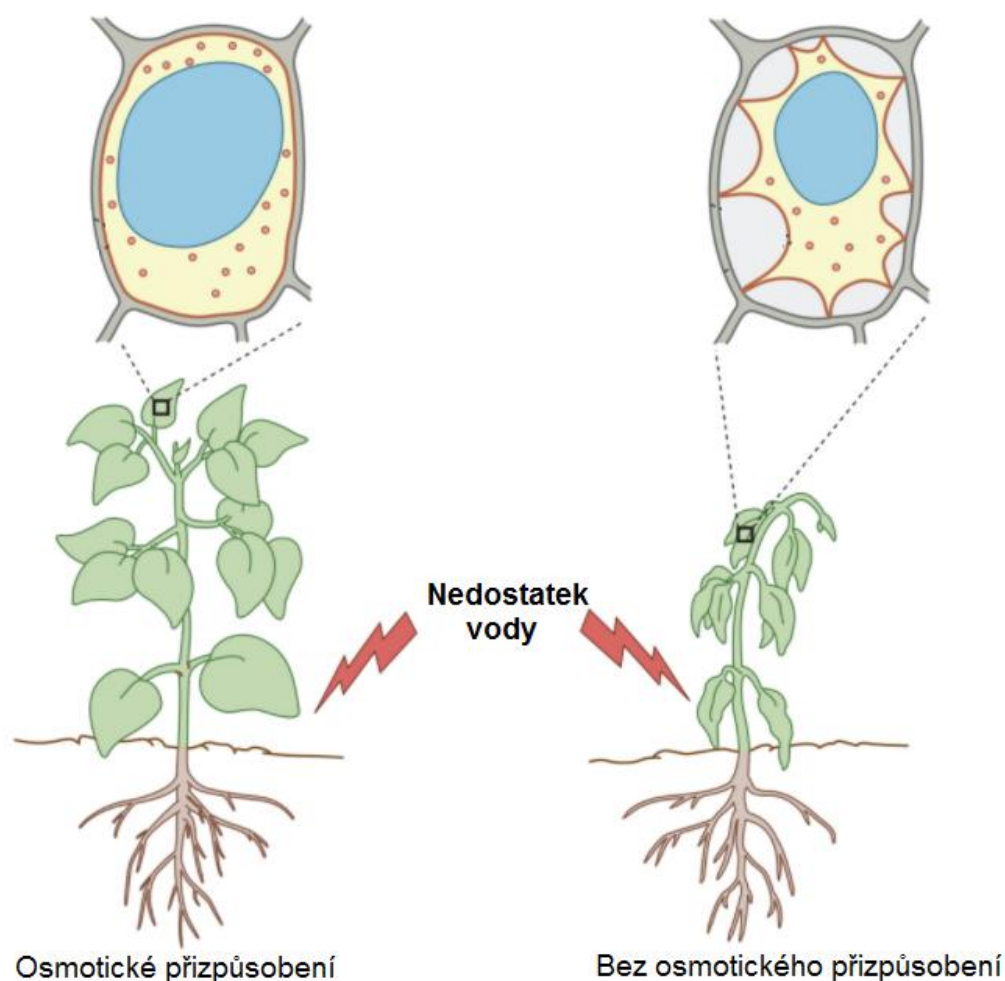
Stav vody v rostlině je charakterizován dvěma parametry, vodním potenciálem a relativním obsahem vody.

Vodní potenciál rostliny určuje, jakým směrem se bude pohybovat kapalná fáze vody dovnitř či vně buňky rostliny. Rozdíl vodních potenciálů mezi membránami rozhoduje o směru toku, zpravidla z místa o vyšším potenciálu do místa s nižším potenciálem. Proto rostliny syntetizují osmolyty, aby snížily potenciál v buňce a voda neunikala (obr. 1) [1].

Relativní obsah vody (Relativ Water Content, RWC) vyjadřuje, kolik z maximálního možného množství vody rostlina skutečně obsahuje. Udává se v procentech a vypočítává se podle následujícího vzorce:

$$\text{RWC (\%)} = \{(W_f - W_d) / (W_t - W_d)\} \times 100;$$

$W_f$  ... čerstvá hmotnost,  $W_d$  ... hmotnost sušiny,  $W_t$  ... hmotnost po nasycení vodou [9].



Obrázek 1: Rostlinná buňka aktivně vytváří osmolyty, aby zachovala pozitivní turgor v buňce. Pokud buňka selže v osmotickém přizpůsobení, již přítomné rozpuštěné látky běžně se nacházející v rostlině, nestačí na udržení turgoru [1].

### 1.2.2. Odpovědi rostlin na stres suchem

#### Morfologické odpovědi rostlin

Mezi morfologické odpovědi na stres patří malá velikost rostliny, předčasná dospělost, snížený počet listů, zmenšená velikost listů a tím redukovaná listová plocha, snížený výnos,

zkrácená životnost listů, zvýšený poměr kořenů k nadzemní části rostliny, snížená celková délka nadzemní části, snížená výška rostliny [10]. První pozorovaná odpověď na stres suchem je snížení rychlosti prodlužování stonku, primárně v důsledku ztráty turgoru způsobenému nedostatkem vody [11].

### **Fyziologické odpovědi rostlin**

Kromě morfologických změn způsobuje sucho i změny fyziologické.

První odpovědí na nedostatek vody je uzavření průduchů, na které má častěji větší vliv vlhkost půdy a následná signalizace kořeny, než stav vody v listech [11, 12]. Signalizaci řídí fytohormon kyselina abscisová, ABA, jejíž hladina vlivem nepříznivých podmínek, jako je pokles turgoru, vzroste, protože se zvýší její syntéza [1]. Zvýšená koncentrace působí jako signál pro rostlinné buňky, aby se přizpůsobily nedostatku vody [13]. ABA spustí kaskádu dalších reakcí.

Odolnost rostlin proti stresu je dosažena komplexními sítěmi signální transdukce prostřednictvím obranných mechanismů jak na ABA závislých, tak na ABA nezávislých [14].

Za účelem zabránění transpirace vodní páry dochází k uzavření průduchů a neprobíhá výměna ani dalších významných plynů, kyslíku a oxidu uhličitého. Dochází také ke zhoršenému proudění floemu (asimilátové translokaci) a nerovnoměrnému přerozdělování biomasy ve prospěch kořenů vůči nadzemní části rostliny jako adaptačnímu mechanismu. Ve výsledku dochází ke sníženému výnosu plodin [7, 11].

Nedostatek vody má negativní dopad i na fotosyntézu, přímo narušuje všechny hlavní komponenty procesu. Fotosyntéza zahrnuje dvě klíčové události, světelnou část, při které se energie světla převádí na chemickou energii v podobě makroergické molekuly adenosintrifosfátu, ATP, a redukčních ekvivalentů nikotinamidadenindinukleotidfosfátu, NADPH, a Calvinův cyklus, ve kterém se fixuje oxid uhličitý a tvoří se sacharidy [12].

Oxidativní stres vzniklý působením sucha vede k oxidaci chlorofylu. Z biochemického hlediska se sucho projevuje vznikem reaktivních forem kyslíku, ROS, na jejichž vznik rostlina odpovídá systémem antioxidačních enzymů [8].

Redukuje se expanze v listové části rostliny. Hlavní příčinou sníženého růstu je pokles dělení buněk v meristému, tedy narušení mitózy [15].

Inhibicí růstu je iniciována syntéza ochranných částic zprostředkovávajících osmotické přizpůsobení. Odpar vody průduchy klesá s rostoucí resistencí rostliny vůči suchu. To vede ke snížení koncentrace oxidu uhličitého v listech a k inhibici fotosyntézy. Nejenže se sníží přísun CO<sub>2</sub> skrze průduchy, ale i difuze CO<sub>2</sub> skrze mezofyl listů [6]. Sucho také snižuje účinnost mezofilních buněk k využití dostupného CO<sub>2</sub> [12], dochází k redukci sušiny [16].

Fotosyntetické pigmenty jsou u rostlin důležité pro zachytávání světla a produkci redukční síly. Chlorofyl a i b jsou citlivé na dehydrataci půdy [8]. Při působení sucha je běžné, že dochází k poklesu obsahu chlorofylu v rostlině [17]. Dochází nejen k poškození fotosyntetických pigmentů, ale i k poškození thylakoidových membrán. [12]. Chlorofyl b je syntetizován z chlorofylu a (syn. chlorifillid a) chlorofyllid-a-oxygenázou [17]. Když dostupnost chlorofylu b přesáhne požadované množství pro import a stabilizaci světlosběrných proteinových antén, zdá se, že přebytečné molekuly chlorofylu b způsobují degradaci chlorofyllidu-a-oxygenázy. Tím se potlačí biosyntéza chlorofylu b a celkově se zvýší poměr chlorofylu a : b. [17]. K tomuto navýšení poměru přispívá též, že degradující se chlorofyl b se může přeměňovat na chlorofyl a [12].

Redukce fotosyntetických pigmentů způsobená poškozením biosyntézy či destrukcí pigmentů vede k narušení elektronového transportu a tím snižuje fotosyntetickou kapacitu ve většině rostlin. Změny vedou ke tvorbě ROS, které omezují fotosyntézu a způsobují oxidativní poškození. Rostliny vyvinuly řadu ochranných mechanismů proti ROS poškození buněčných komponent, jako je odvod nadbytečné excitační energie a syntéza ochranných pigmentů, karotenoidů a antokyanů [12].

Fotosyntéza je inhibována kvůli narušení biochemických procesů, které jsou zahrnuty ve PSII a dochází současně k přerušení necyklické fosforylace, což vede k nerovnováze mezi uvolňováním a využitím elektronů, což vede ke snížení přenosové rychlosti elektronů [17].

Celkové snížení obsahu chlorofylu vede ke snížení světlosběrné kapacity. Takto snížený obsah fotosyntetických pigmentů je přičítán ultrastrukturální deformaci plastidů včetně proteinových membrán tvořících thylakoidy. Je způsobeno rozvolnění PSII, který proto nezachytí fotony. Takto poklesne účinnost PSII a poklesne přenos elektronů [17].

Narušování fotosyntézy může také zapříčinit poškození biosyntetických drah chlorofylu nebo jeho degradaci způsobenou stresem [17].

Největší pokles fotosyntetické kapacity má na svědomí přímý dehydratační účinek sucha na ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasu/oxygenasu, Rubisco. Způsobuje její hydrolýzu nebo pokles jejích katalytických schopností [17].

Rostliny vyvinuly řadu ochranných mechanismů proti ROS indukovanému poškození buněčných komponent, například rozptýlení nadbytečné excitační energie pomocí ochranných pigmentů jako jsou karotenoidy a antokyany. Tato obrana je důležitá pro ochranu fotosyntetické aktivity jako celku. Kromě toho malá frakce karotenoidů, která není vázána na bílkoviny, slouží jako antioxidanty v lipidové části fotosyntetických membrán [17].

Lutein i  $\beta$ -karoten jsou schopny působit jako akceptory energie, čímž uvolňují excitované molekuly chlorofylu. Řada studií provedených *in vivo* ukázala, že stres vzniklý suchem působí značnou škodu bílkoviny, která vyvíjí kyslík ve PSII a způsobuje degradaci thylakoidního membránového proteinu D1, což vede k inaktivaci reakčního centra PSII [17].

Pokud jsou rostliny na stres suchem adaptovány, jejich proteom po vystavení tomuto stresu neprojevuje významné změny oproti stavu při optimálních podmínkách. U těchto rostlin se pozměňuje transkriptom mnohem více než později proteom [12].

### **1.3. Teplotní stres**

Každá rostlina potřebuje pro svůj optimální růst optimální teplotu. Při jejím dosažení vykazují rostliny maximální rychlost růstu. Soubor teplotních podmínek, které jsou optimální pro určitou rostlinu, může být stresující pro rostlinu jinou [18]. Pokud se teplota vychýlí od optima, dojde ke změnám integrity membrány, genové exprese a metabolické homeostázy [19].

Při vystavení vysokým teplotám může být tolerance stresu vyvolána vystavením krátkodobě zvýšené teplotě a je známá jako získaná termotolerance, zatímco při nižších teplotách může být tolerance stresu vyvolána expozicí snížené teplotě a je známá jako odolnost vůči ochlazování (chilling tolerance) nebo jako aklimatizace ke chladu (cold acclimation) [18].

Vystavení rostlin teplotnímu stresu vede k modifikaci metabolismu, který se mění s rostoucí a klesající teplotou. Teplotní stres mění strukturu, katabolické vlastnosti a funkci enzymů a membránových transportérů metabolitů. Zajímavostí je, že regulační mechanismy rostlin

se aktivují a obnovují normální hladinu metabolitů. Dále se metabolické modifikace pojí s tolerančním mechanismem. Mnoho metabolitů přispívá ke zlepšení stresové tolerance [18].

Při nízké teplotě se snižuje rychlost enzymatických reakcí, tudíž i Calvinova cyklu a snižuje se syntéza sacharidů a tím i růst. Při vysokých teplotách se zvyšuje oxygenázová aktivita Rubisco, zvyšuje se podíl fotorespirace, klesá syntéza sacharidů a tvorba biomasy [20].

### **1.3.1. Stres horkem**

Vysoká teplota mění anatomickou strukturu listů, například tvar chloroplastů, otok stromatálních lamel, deformace vakuol, které mění strukturální uspořádání thylakoidů a vytváří PSII s vyčerpanými anténami, což ve výsledku redukuje fotosyntetické a respirační aktivity [21]. Horko má velký dopad na plnění zrn [22].

### **1.3.2. Stres způsobený nízkou teplotou**

Chladová tolerance je schopnost rostliny tolerovat nízkou teplotní mez 15–0 °C, aniž by došlo k poranění či poškození. Aklimace vůči chladu je získaná tolerance vůči fyzikálnímu a fyzikálně chemickému působení stresu vyvolanému mrznutím [18]. Fytormon zodpovědný za odpověď na stres je ethylen [19].

## **Chlad**

Chlad má škodlivý účinek na změny v uspořádání lipidů v biomembráně, snižuje tak její fluiditu. K poškození mohou přispět další faktory vyvolané namáháním stresem z chladu. Snížení rychlosti všech enzymových reakcí, tedy i snížení rychlosti Calvinova cyklu [18].

Patří sem syntéza a akumulace kompatibilních rozpustných látek, syntéza bílkovin indukovaná chladem, změny metabolismu uhlovodíků a posílení buněčného potenciálu v zachytávání radikálů [18].

Ve výsledku stres chladem vede ke ztrátě integrity membrány, vedoucí k úniku rozpuštěných látek. Dále narušuje integritu intracelulárních organel, což vede k ztrátě kompartmentace a také způsobuje redukcii a zhoršení fotosyntézy, agregaci bílkovin a obecné metabolické procesy. Aklimace způsobuje nárůst metabolitů, kterými jsou osmoprotektanty a osmolyty. Navíc určité metabolity indukované během aklimace mohou působit jako signály pro genovou expresi. Například akumulace prolinu, známého osmoprotektantu, může indukovat exprese mnoha genů, které mají ACTCAT sekvenci v promotoru na něj reagující [18].

Obecně bylo zjištěno, že rostliny pocházející z teplých stanovišť vykazují příznaky zranění již při vystavení nízkým nemrazovým teplotám. Výskyt příznaků poranění závisí na citlivosti rostliny na zátěž chladem a liší se od rostliny k rostlině. K poškození rostliny vyvolanému chladovým stresem může dojít po 48 až 72 hodinách působení stresu [18].

Rostliny vystavené stresu chladem vykazují řadu fenotypových znaků, které zahrnují snížení dilatace listů, vadnutí a chlorózu (žloutnutí listů) a může vést až k nekróze (odumření pletiva) [18].

Stres chladem také výrazně ovlivňuje reprodukční vývoj rostlin, v době kvetení může vést ke sterilitě [18].

Stres chladem obecně vede ke špatnému klíčení, zakrnění sazenic, zežloutnutí listů, vadnutí a redukci růstu výhonů. Chlad působící během reprodukčního stádia rostliny způsobuje zpoždování a sterilitu pylu, což je klíčovým faktorem zodpovědným za snížení výnosu plodin [18].

Nasycenost mastných kyselin v membráně má vliv na její fluiditu, s rostoucím množstvím nenasycených mastných kyselin fluidita roste. Při změně teploty se membrány mění z polotekutého stavu do stavu polokrystalického. Rostliny citlivé na chlad mají obvykle vyšší obsah nasycených mastných kyselin v plazmatické membráně. Naopak rostliny, které jsou vůči chladu odolné, mají větší podíl nenasycených mastných kyselin, proto membrána zůstane tekutá i při nižších teplotách [18]. Záleží, do jaké míry jsou schopné vzájemné přeměny nasycených a nenasycených mastných kyselin v membránových lipidech pro pozvolné vyrovnávání fluidity [1].

## **Mráz**

Nebezpečí pozdních jarních mrazíků či předčasných podzimních mrazíků si vyžaduje odolnost rostlin vůči mrazu. Mráz způsobuje tvorbu ledu, který poškozuje rostliny. Tvorba ledu v rostlinných tkáních vede k dehydrataci, která vede k poškození plazmatických membrán [18].

Led se tvoří v apoplastu rostlinného pletiva, protože má relativně nižší koncentraci rozpuštěných látek [18].

Tlak páry ledu je mnohem nižší než tlak páry vody, proto led v apoplastu vytváří gradient tlaku par mezi apoplastem a okolními buňkami. V důsledku tlakového gradientu putuje

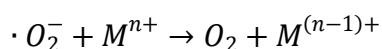
cytoplazmatická voda z buněčného cytosolu do apoplastického prostoru. Tím nadále narůstají krystalky ledu a způsobují mechanické namáhání buněčných stěn a plazmatických membrán, což vede k prasknutí buněk [18].

## 1.4. Oxidativní stres

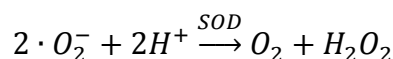
Při jednotlivých typech stresů dochází k tvorbě Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species, ROS).

ROS jsou částečně redukované nebo aktivované formy vzdušného kyslíku. Patří sem superoxidový aniontový radikál ( $\cdot O_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), alkoxidové radikály (RO) a singletový kyslík ( $O_2^1$ ) [23].

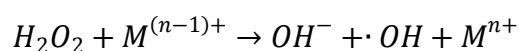
Pokud zvýšené množství redukovaného ferredoxinu, nemá PSI kam předávat elektrony. Elektron je přenesen na kyslík za vzniku superoxidového radikálu ( $\cdot O_2^-$ ). Tento proces se nazývá Mehlerova reakce (obr. 2). Superoxidový radikál redukuje kovové ionty přítomné v buňce  $Fe^{3+}$  a  $Cu^{2+}$  ( $M^{n+}$ ):



Superoxid dismutáza, SOD, katalyzuje dismutaci  $\cdot O_2^-$  na  $H_2O_2$  a  $O_2$  doprovázenou příjmem dvou protonů (Haber-Weissova reakce)[24].

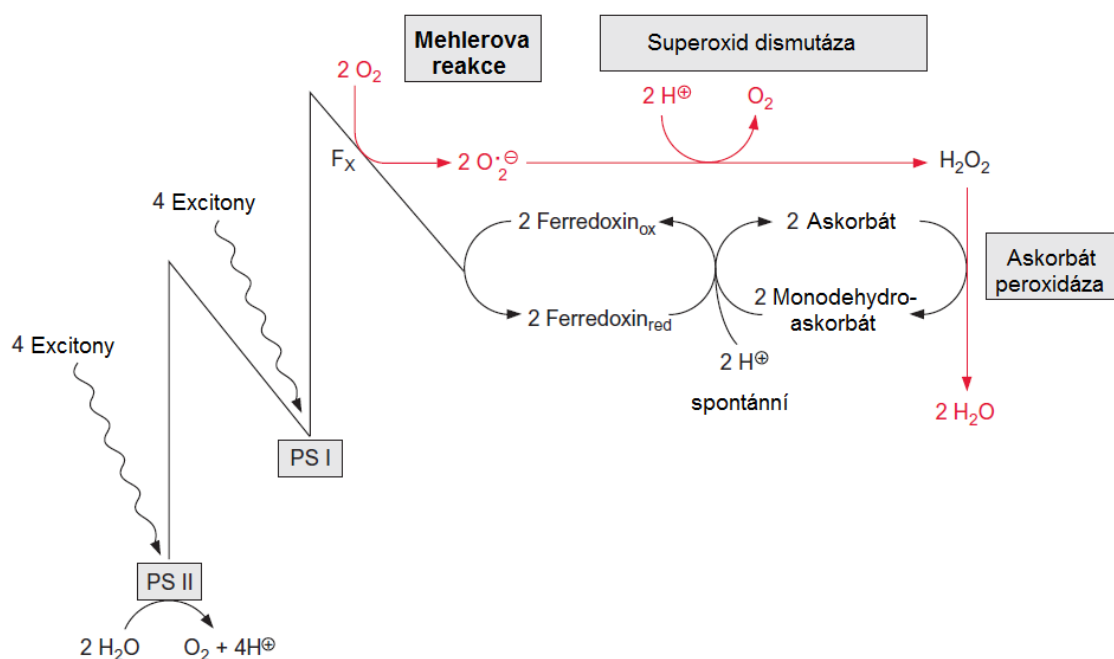


Kovové ionty jsou redukované superoxidem a reagují s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu (Fentonova reakce) [25]:



Před poškozením chrání askorbát v thylakoidové membráně působící jako antioxidant [24].





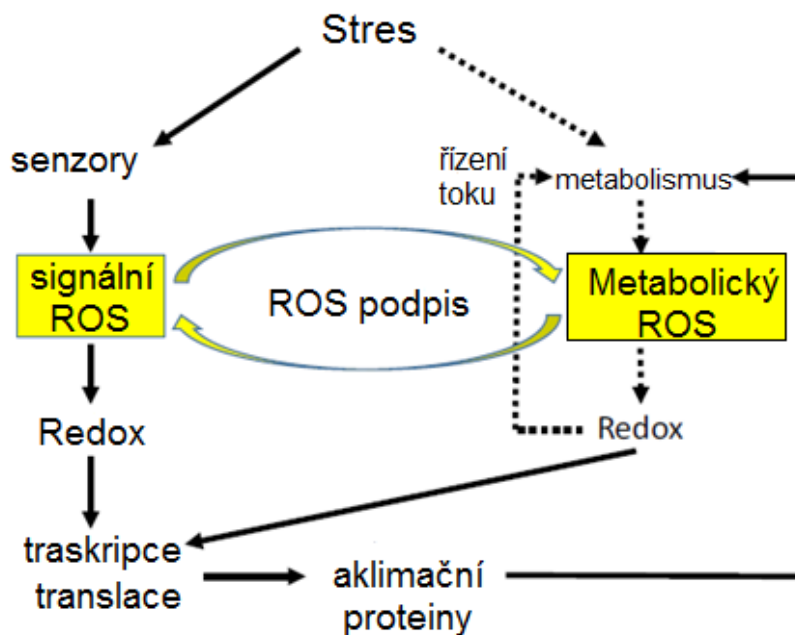
Obrázek 2: Schéma Mehlerovy reakce. Při nedostatku ferredoxinu se elektrony přenesou z PSI na kyslík za vzniku superoxidu. Eliminace tohoto vysoce agresivního superoxidového radikálu zahrnuje reakce katalyzované superoxidodismutázou a askorbátovou peroxidázou [24].

Lipidová peroxidace je hlavním poškozením v důsledku oxidativního stresu [26], jehož markerem je malondialdehyd [27].

ROS hrají klíčovou roli při aklimačním procesu rostlin na abiotický stres (obr. 3). Primárně fungují jako signální transdukční molekuly, které regulují různé cesty během aklimace rostlin na stres, ale zároveň jsou také toxickými vedlejšími produkty stresového metabolismu. Každý kompartment v rostlině obsahuje vlastní sadu reakčních drah produkujících či zachytávajících ROS [23].

Nízká hladina ROS má signalizační roli, zatímco zvýšená koncentrace může způsobit smrt [28].

Produkce ROS v chloroplastech může odvést elektrony z fotosyntetického aparátu. Chrání tak světlosběrné antény před přehlcením a následným poškozením. Obdobnou funkci ROS můžeme nalézt i v mitochondriích [29].



Obrázek 3: Úloha ROS při aklimaci vůči abiotickému stresu; Dva hlavní zdroje ROS během stresu, signální a metabolické ROS, interagují a vytvářejí ROS podpis, kterým řídí aklimaci rostlin na stres přes redoxní reakce, které regulují transkripci a translaci stresových aklimačních proteinů a enzymů [23]

V rostlině pod stresem dochází k nerovnováze mezi množstvím ROS a antioxidanty. Dokud se nachází ROS na nízké hladině, slouží jako signální molekuly stresu, ale při jejich nárůstu může dojít k poškození až smrti rostliny [30].

Antioxidační obrana může být neenzymatická pomocí glutathionu, prolinu, alfa-tocoferolu, karotenoidů, askorbátu, polyaminů, fenolů a flavonoidů nebo může být enzymatická pomocí SOD, katalázy (CAT), glutathion peroxidázy (GPX) a glutathion reduktázy (GR) [1, 25, 31].

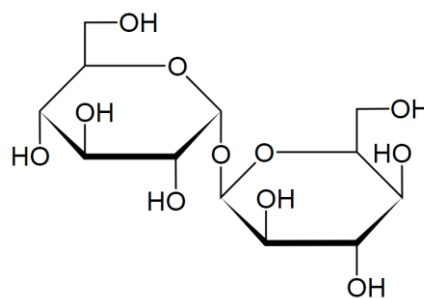
CAT, askorbát peroxidáza (APX) a GPX jsou tři enzymy zodpovědné za zachytávání  $H_2O_2$ , které tak chrání rostlinu před jeho akumulací nad toxickou hranici přeměnou na  $H_2O$  a  $O_2$  [26, 28].

## 1.5. Obranné mechanismy umožňující se stresu vyhnout či ho tolerovat

Suchu se mohou při vývoji rostliny bránit avoidancí (vyhýbáním se), snížením vzrůstu, či restitencí, úpravou homeostázy buňky, což se odrazí v udržení fotosyntézy a proteomové stability během sucha [22]. V této práci se zmíním pouze o několika vybraných zástupcích.

### 1.5.1. Trehalosa

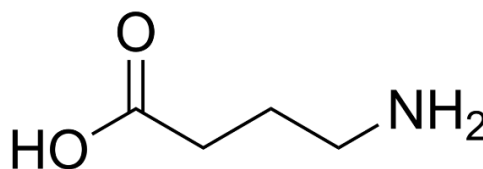
Trehalosa (obr. 4) je přírodní disacharid, který je zástupcem cukrů podílejících se na osmoprotekci. Funguje jako kompatibilní rozpuštěná látka, jejíž funkcí je stabilizovat makromolekuly za působení stresových podmínek. Na její biosyntéze se podílejí dva enzymy, trehalóza-6-fosfátsyntáza a trehalóza-6-fosfátfosfatáza. Kromě glukózy a sacharózy je trehalóza jedním ze tří hlavních sacharidků, které se podílejí na signalizaci v rostlinných buňkách [32].



Obrázek 4: Threhalosa

### 1.5.2. GABA

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, GABA (obr. 5) je neproteinogenní aminokyselina. Rychle akumuluje na vysoké hladiny koncentrace za různých stresových podmínek. GABA je hlavně syntetizován z glutamátu v cytosolu pomocí

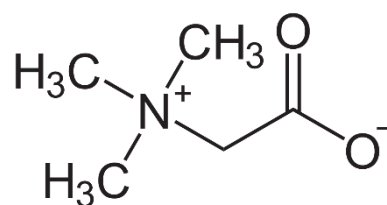


Obrázek 5: GABA

glutamát dekarboxylázy a pak je transportována do mitochondrií [33]. GABA působí při osmoregulaci, dokonce byla objevena určitá spojitost s ochrannou proti oxidativnímu stresu, při omezení syntézy GABA v *Arabidopsis* byla pozorována snížená odolnost vůči tomuto stresu [34].

### 1.5.3. Glycin betain

V rostlinách se glycin betain, GB, (obr. 6) syntetizuje oxidací cholinu. Enzym cholinmonooxygenáza nejprve převede cholin na betain aldehyd a pak  $\text{NAD}^+$  závislý enzym, betain-aldehyd dehydrogenáza produkuje GB. Tyto enzymy se vyskytují hlavně ve stromatu chloroplastů a jejich aktivita se zvyšuje v reakci na stres způsobený solemi. U *Arabidopsis* řídí syntézu gen *codA*.



Obrázek 6: Glycin betain

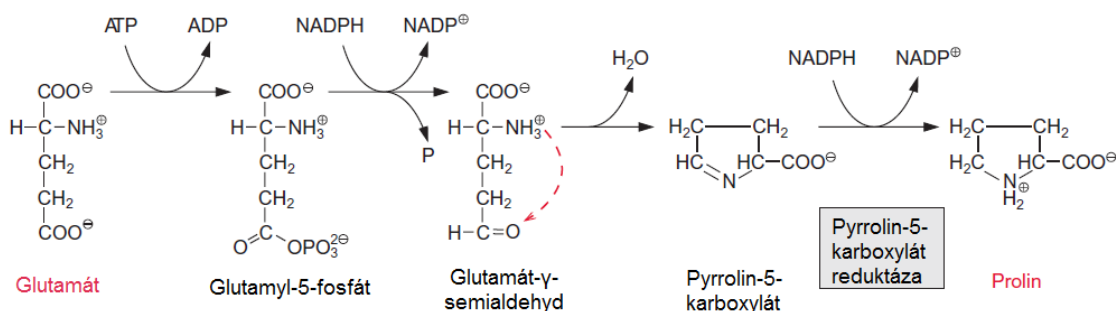
V různých druzích rostlin se jeho úloha částečně liší. Chrání fotosyntézu, konkrétně PSII, tak, že udržuje konformaci enzymů a opravuje ji jako chaperon. Zabraňuje inhibici syntézy proteinů a tím zvyšuje obnovu PSII. Zvýšená produkce ROS vede k fotoinhibici PSII

v chloroplastu, GB stabilizuje aktivitu opravných proteinů. Akumulace GB v chloroplastu je výhodnější než v cytosolu [35].

#### 1.5.4. Prolin

Prolin je proteinogenní aminokyselina, je konformačně rigidní a esenciální pro metabolismus. Mimo jiné slouží při obraně vůči stresu, který mění vodní status rostliny, tj. sucho, salinita a mrznutí [36, 37].

Prekurzorem pro syntézu prolinu je glutamát (obr.7).  $\delta$ -Karboxylová skupina je přeměněna glutamát kinázou na energeticky bohatou fosfátovou skupinu a poté je redukována pomocí NADPH na aldehyd. Kruh je tvořen intramolekulární kondenzací karbonylové skupiny s  $\alpha$ -aminoskupinou. Redukce pomocí NADPH vede ke zformování prolinu [24]. Alternativou syntézy prolinu je ornithinová cesta [36].



Obrázek 7: Biosyntéza prolinu z glutamátu [24].

Ve většině druhů rostlin je syntéza enzymu pyrrolin-5-karboxylát syntetáza kódován dvěma geny a enzym pyrrolin-5-karboxylát reduktáza jedním genem.

Katabolismus prolinu se nachází v mitochondriích. Syntetizovat se může v různých buněčných kompartmentech v závislosti na podmínkách. Pro běžné funkce je syntetizován v cytosolu mezofilních buněk listů, u *Arabidopsis* na základě genu P5CS2. Při působení osmotického stresu syntéza probíhá v chloroplastu, kde dochází i k jeho akumulaci, u *Arabidopsis* je syntetizován na základě genu P5CS1 [36].

Prolin má více funkcí při obraně proti stresu: 1. Slouží jako osmoprotektant, jeho akumulace snižuje buněčný osmotický potenciál, aby se vyrovnal poklesu potenciálu půdní vody a umožnil tak zachovat stav vody a její turgor v rostlině. Prolin se akumuluje v cytoplazmě a stromatech chloroplastů, zatímco další látky (cukry, organické kyseliny a draslík) se akumuluje ve vakuolách. Protože cytoplazma tvoří jen malou objemovou frakci

z celkového objemu tkáně, dosahuje prolin mnohem vyšších koncentrací než ve zbytku tkáně. Poměrně malá změna množství prolinu může mít větší efekt na celkové osmotické přizpůsobení tím, že způsobí další akumulaci draslíku a jiných solutů ve vakuole [37].

2. Prolin má takové vlastnosti (vysoká rozpustnost, zwitterion), že nenarušuje buněčnou strukturu, což mu umožňuje akumulovat se v cytoplazmě. Při poklesu vody může prolin včetně dalších látek působit jako náhražka vody za účelem stabilizace buněčné struktury prostřednictvím hydrofilních interakcí a vodíkových vazeb [37].

3. Prolin může sloužit přibližně jako pufr, jelikož při jeho syntéze je využíváno NADPH, zatímco při jeho katabolismu v mitochondriích se reduktant uvolňuje, čím umožní ovlivňovat redoxní rovnováhu v buňce [37].

4. Prolin se využívá jako pufr k přenosu a ukládání reduktantů (a dusíku) po celé rostlině. Syntéza a katabolismus prolinu mohou být odděleny časově (např. syntéza při stresu a katalýza po něm) a prostorově (např. syntéza ve fotosyntetické části rostliny a katalýza v kořenové části). Rychlý pokles hladiny prolinu po ukončení stresu může být jedním z faktorů obnovení růstu [37].

5. Prolin má signalizační funkci, řídí navýšení produkce reaktivního kyslíku v mitochondriích a buněčnou smrt. Souvisí se zpožděním stárnutím rostliny a získají tím zlepšenou odolnost proti suchu [37].

6. Prolin je schopen zachytávat a reagovat s ROS, což může být nejdůležitější vlastnost při extrémní dehydrataci [37].

#### **1.5.5. LEA proteiny**

Proteiny hojné při pozdní embryogenezi (Late embryogenesis abundant proteins, LEA proteiny) slouží k zamezení ztráty vody za nepříznivých podmínek, proto jsou také nazývané dehydriny. V roztoku jsou v podstatě nestrukturované, protože jsou extrémně hydrofilní a upřednostňují interakce s vodou oproti interakcím v rámci řetězce. V nejvyšší koncentraci se vyskytují v semenech ve fázi dozrávání. Jejich výskyt souvisí s odolností vůči vysychání. Dále se zjistilo, že zvyšují odolnost vůči chladu, mrazu, salinitě a osmotickému stresu. Ochraňují proteinovou strukturu [38]. Byla nalezena korelace mezi relativní akumulací dehydrinů a odolností rostlin vůči mrazu [39].

### **1.5.6. Heat shock proteiny**

Pokud teplota přesáhne o více než 5 °C optimální teplotu, začne se syntetizovat malá sada heat shock proteinů namísto běžných proteinů. Heat shock proteiny mimo jiné zvyšují odolnost rostliny vůči vysokým teplotám [40]. Heat shock proteiny, mezi které se řadí i chaperony, odpovídají za skládání, sestavování, translokaci a degradaci bílkovin v mnoha normálních buněčných procesech, stabilizaci bílkovin a membrán a mohou napomáhat při opětovném skládání proteinů za stresových podmínek. Hrají klíčovou roli při ochraně rostlin vůči stresu tím, že obnoví normální proteinovou konformaci a současně i buněčnou homeostázu [41].

## **1.6. Kombinace stresových vlivů horka a sucha**

Kombinace stresů má vždy mnohem horší dopady než jednotlivé stresy zvlášť. V přírodě se stresové vlivy kombinují běžně.

Sucho způsobuje morfologické změny, hlavně redukci vzrůstu rostliny. Sucho v kombinaci s horkem způsobí nejen významně snížený vzrůst, ale také seschnutí spodních listů. Sucho má větší vliv na morfologii rostliny než na její fyziologii. Zatímco zvýšená teplota má větší vliv na fyziologii rostliny než sucho, nemá téměř vliv na celkovou biomasu a vzrůst jako sucho. Nejsilnější fenotypové změny rostliny působí kombinace sucha a zvýšené teploty. Sucho způsobuje hlavně změny vegetativních rysů, jako je biomasa a vzrůst rostliny a horko způsobuje změny generativních rysů [22].

Navzdory velmi vysokým teplotám vzduchu si bavlníkové rostliny udržely vysokou průduchovou vodivost a transpirační rychlost, pokud měly během růstu dostatečnou zálivku, čímž se účinně vyhýbaly tepelnému stresu díky chlazení odpařováním [42].

Naneštěstí schopnost moderních kultivarů odolat vysokým teplotám spočívá spíše na avoidanci vysokých teplot než toleranci vůči nim, a tak jsou vysoce závislé na nadměrném využívání vody [42].

Již bylo zmíněno, že během sucha se uzavírají průduchy kvůli ztrátám vody, čímž zamezují přístupu CO<sub>2</sub>. Pro mnoho druhů rostlin při koncentraci CO<sub>2</sub> 40 až 70 ppm nastane rovnováha mezi rychlostí fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub> a uvolňováním CO<sub>2</sub> při fotorespiraci, která chrání rostlinu před fotooxidativním poškozením. Běžně je atmosférická koncentrace CO<sub>2</sub> 330 ppm, proto fixace uhlíku převládá. Při rostoucí teplotě roste oxygenázová aktivita

Rubisco rychleji než karboxylázová. Během horkých dní, když fotosyntéza vyčerpá hladinu  $\text{CO}_2$  v chloroplastu a zvýší hladinu  $\text{O}_2$ , může rychlost fotorespirace dosáhnout rychlosti fotosyntézy. To je hlavní limitující faktor růstu většiny rostlin. Fotorespirace představuje významné energetické ztráty, protože dochází ke spotřebě ATP a NADPH. Rostliny, které by dosáhly výrazně nižší oxygenázové aktivity Rubisco, by snížily ztráty vody, protože by nemusely mít otevřené průduchy po tak dlouhou dobu, aby získaly dostatek  $\text{CO}_2$ . Také by stačilo menší množství hnojiv, protože by stačilo méně Rubisco [20].

## **1.7. Záplavy a nedostatek kyslíku**

Nejen sucho trápí rostliny. Opačným extrémem jsou záplavy, které omezují difuzi plynů mezi ponořenými orgány a okolním vodním prostředím. Omezená výměna kyslíku a  $\text{CO}_2$  zpomaluje aerobní dýchání a fotosyntézu. Kalné a bahnité záplavové vody zamezují také pronikání světla a ohrožují tak fotoautotrofní biosyntézu cukrů. Dalším ohrožením je nedostatek kyslíku v zaplavené půdě a hromadí toxické sloučeniny, které omezují růst kořene. Tomuto stresu se však na rozdíl od předchozích zmíněných stresů rostlina přizpůsobuje morfologickými změnami [43].

## **1.8. Využití poznatků studia v pěstitelství**

Dříve se šlechtilo pouze primitivním výběrem nejlepších rostlin, čímž byl urychlen přirozený vývoj. Zakladatel šlechtění T. A. Knight (1759-1838) začal používat hybridizaci k cílevědomému šlechtění. Později L. L. Vilmorin (1816-1860) postupně zavedl pokrokovější individuální výběr rostlin a zdůrazňoval, že šlechtitelská hodnota rostliny se nemůže posuzovat jen podle individuálního vzhledu a hodnoty, ale na základě jejího potomstva, což znamená počátek moderního šlechtění [44].

Genetika odolnosti rostlin vůči abiotickým stresům je velmi složitá. Pro chladuvzdornost a mrazuvzdornost je polygenního charakteru, souvisí s dědičností dílčích složek komplexu odolnosti. Genetika suchovzdornosti je složitá vzhledem k mnoha faktorům, které ji podmiňují nebo ovlivňují. U mnohých druhů není ani prostudovaná. Aby bylo možné určit, které rostliny mají chtěné vlastnosti a jakého charakteru, je třeba volit metody laboratorní, například porovnávání tvorby hmoty v podmínkách sucha a podmínkách závlahy v klimatických boxech nebo se používají i nepřímé metody. U novošlechtěných odrůd se využívají polní podmínky a porovnává se dosažení produkce například v suchých a normálních oblastech v průběhu roku [44].

Metody šlechtění jsou nejčastěji kombinační křížení s využitím donorů genů odolnosti z krajových odrůd nebo odrůd z příslušných oblastí, jako jednoho z rodičů, nebo odrůd z oblastí vystavených určitému abiotickému stresu, případně rostlin s hledanými vlastnostmi. V některých případech se využívá i vzdáleného křížení a polyploidie [44].

Oblast není dosud dostatečně prostudovaná a zaslouží si velkou pozornost vzhledem k neustálým klimatickým změnám a potřebě získávat dostatečné množství plodin za využití větších zatím zemědělsky nevyužitých ploch pro neustále narůstající množství lidí.

## 2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je analyzovat poskytnuté populace kostřavy pěstované za odlišných podmínek vlhkosti a teploty.

- 1) Zjistit, zda se vzorky kostřavy liší v aktivitě Rubisco.
- 2) Zjistit, zda se vzorky kostřavy liší v aktivitě, případně izoenzymovém složení šikimátdehydrogenázy.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Přístroje

- Aparatura na elektroforézu (Biometra)
- 1. spektrofotometr: Helios  $\gamma$  (Thermo)
- 2. spektrofotometr: Ultrospec 2100 (Amersham Pharmacia Biotech)
- Centrifuga: Univerzal 32R (Hettich)
- pH metr: UltraBASIC (Denver Instruments Company)
- analytické váhy: Model 100A (Denver Instruments Company)

### 3.2. Chemikálie

- 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma, USA)
- Akrylamid (Sigma, USA)
- Ammonium persulfát (Sigma, USA)
- ATP (Sigma, USA)
- Bradfordovo činidlo (Sigma, USA)



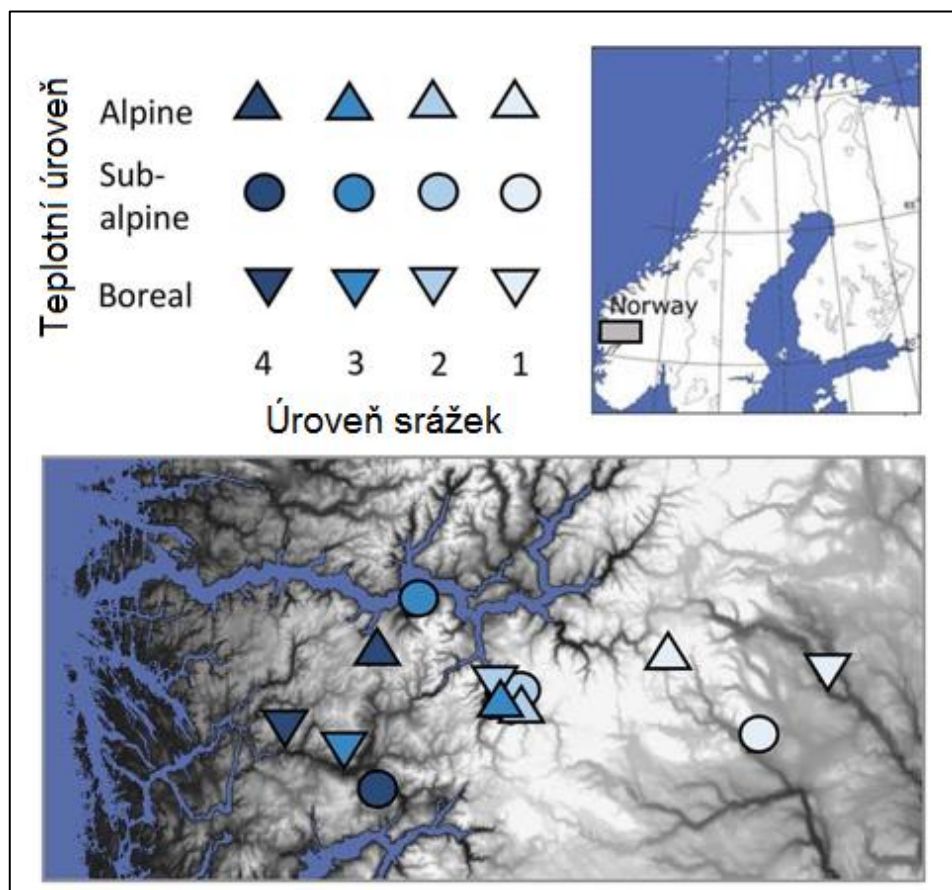
- Bromfenolová modř 0,1% (Sigma, USA)
- DTT (Sigma, USA)
- EDTA (Sigma, USA)
- Fenazin methosulfát (Sigma, USA)
- fosfokreatinu (Sigma, USA)
- glycin (Serva, Německo)
- glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (Sigma, USA)
- glycerol (Lach-ner, Česko)
- HEPES (Sigma, USA)
- Hovězí sérový albumin (Sigma, USA)
- kreatinfosfokináza (Sigma, USA)
- Kyselina šikimová (Sigma, USA)
- NADH (Sigma, USA)
- NADP<sup>+</sup> (Panreac AppliChem, Německo)
- Nitroblue tetrazolium chlorid (Sigma, USA)
- PVP (Sigma, USA)
- ribosa-5-fosfátu (Sigma, USA)
- sacharosa (Penta Česko)
- TEMED (Thermo, Japonsko)
- Tris (Honeywell Fluka, USA)
- ostatní chemikálie (Lachema, Česko)

### 3.3. Rostlinný materiál

Vzorky byly poskytnuty RNDr. Blankou Vlasákovou, PhD. z Botanického ústavu AV ČR. Jednalo se o populace kostřavy (*Festuca rubra* L.) nacházející se na čtyřech různých stanovištích v jižním Norsku (obr. 8). Tato stanoviště se lišila klimatickými podmínkami, tedy nadmořskou výškou, průměrnou roční teplotou a srážkami (tab. 1). Tito genetičtí jedinci byli pěstováni v klimatizovaných boxech lišících se teplotou a vlhkostí (tab. 2). Odebrané listy (přibližně 0,5 g) byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při teplotě -80 °C.

Tabulka č.1: Stanoviště sběru pokusných rostlin

Název lokality	Lokalita	nadmořská výška [m nad mořem]	srážky [mm]	teplota [°C]
Ulvhaugen	Alpine 1	1 208	596	6,17
Skjellingahaugen	Alpine 4	1 088	2 725	6,58
Fauske	Boreal 1	589	600	10,30
Ovstedal	Boreal 4	346	2 923	10,78



Obrázek 8: Umístění dvanácti stanovišť podle teplotního a srážkového gradientu ve fjordové krajině v jižním Norsku

Tabulka č.2: Podmínky v klimatizovaných boxech

Klimatizovaný box	režim klimatizovaného boxu
A	chladný, vlhký
B	teplý, vlhký
C	chladný, suchý
D	teplý, suchý

### **3.4. Metody**

#### **3.4.1. Extrakce rostlinného materiálu**

Byl připraven extrakční pufr (100 mM Tris - HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 5% glycerol) tak, že bylo naváženo 12,11 g Tris, 0,1542 g DTT, 0,3802 g EDTA a 1,0167 g MgCl<sub>2</sub>. Navážky byly rozpuštěny v kádince. Odměrným válcem bylo přidáno 50 ml glycerolu. Pomocí HCl bylo upraveno pH na 7,8. Pufr v odměrném válci byl doplněn dH<sub>2</sub>O na 1 l.

Listy kostřavy byly homogenizovány ve třecí misce pomocí tekutého dusíku na drobnou drť. Poté byl přidán extrakční pufr v 2,5násobku hmotnosti vzorku. Extrakt byl přenesen do mikrozkušavek a bylo přidáno PVP. Extrakt byl centrifugován v úhlovém rotoru při 16 602 g 15 minut za chlazení na 4 °C. Supernatant byl přenesen pipetou do nových mikrozkušavek.

#### **3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda**

K 10 µl vzorku bylo pipetováno 23,3 µl dH<sub>2</sub>O a 1 ml Bradfordova činidla. Po 10 min byla na spektrofotometru Ultrospec 2 100 změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Kalibrace byla provedena pomocí hovězího sérového albuminu.

#### **3.4.3. Stanovení aktivity Rubisco**

Předem byl připraven 1 M HEPES KOH pufru o pH 7,5. K 70 ml dH<sub>2</sub>O bylo naváženo 23,83 g HEPES; pH bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 7,5. Poté byl roztok doplněn dH<sub>2</sub>O na 100 ml.

Dále byl připraven roztok enzymů a substrátu tak, že bylo naváženo 0,010 g ATP, 0,002 g NADH a 0,013 g fosfokreatinu, navážka byla rozpuštěna v malém množství HEPES pufru. K roztoku bylo pipetováno 120 µl 50 U/ml 3-fosfoglycerátkinázy, 120 µl 50 U/ml glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy a 120 µl 50 U/ml kreatinfosfokinázy. Roztok byl doplněn HEPES pufrem na 10 ml.

Do kyvety bylo pipetováno 50 µl 20 mM MgCl<sub>2</sub> a 50 µl 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 50 µl extraktu a 50 µl 25 mM ribosa-5-fosfátu. Objem byl doplněn 800 µl předem připraveného roztoku.

Na spektrofotometru Helios γ byla měřena změna absorbance při 340 nm během 5 minut.

#### **3.4.4. Stanovení aktivity šikimátdehydrogenázy**

Předem byl připraven pufr 0,35 M tak, že navážka 3,14 g 2-amino-2-methyl-1-propanolu byla rozpuštěna ve 80 ml dH<sub>2</sub>O. Pomocí 1 M NaOH bylo upraveno pH na 9,0. Roztok byl doplněn dH<sub>2</sub>O na 100 ml.

Pro vlastní stanovení bylo pipetováno 300 µl 100 mM šikimové kyseliny, 200 µl 10 mM NADP<sup>+</sup>, 4 ml 2-amino-2-methyl-1-propanolového pufru o pH 9 a 5 ml dH<sub>2</sub>O. Vzniklo 9,5 ml reakčního roztoku. Do kyvety bylo pipetováno 950 µl reakčního roztoku a 50 µl extraktu.

Na spektrofotometru Helios α byla měřena změna absorbance při 340 nm během 5 minut.

#### **3.4.5. Nativní elektroforéza**

Podle Laemmliho [45] byl připraven 10% separační gel a 5% zaostřovací gel, s tím rozdílem, že místo dodecylsírany sodného byl použit 10% glycerol.

Mezi dvě odmaštěná skla byl nalit 10% dělicí gel cca 1cm pod okraj a byl převrstven dH<sub>2</sub>O, aby bylo zamezeno přístupu vzduchu. Po zatuhnutí byla voda slita a byl nalit 5% zaostřovací gel až po okraj a byl vložen hřeben pro vytvoření potřebných jamek.

Aby bylo možné nanášet extrahované vzorky do gelu, byly ke 150 µl vzorku přidány 0,03 g sacharosy.

Předem byl také připraven elektrodový pufr tak, že bylo naváženo 18,8 g glycinu a 3 g Tris. Navážka byla rozpuštěna ve 400 ml dH<sub>2</sub>O. Odměrným válcem bylo přidáno 10 ml 10% roztoku glycerolu a 18 ml dH<sub>2</sub>O.

Z desek byla odstraněna těsnicí gumička a hřeben a byly upevněny do elektroforézní aparatury, do které byl nalit elektroforetický pufr. Ve vrchní části aparatury bylo do pufru přidáno 100 µl 0,1% bromfenolové modři. Pomocí mikrolitrové stříkačky (Hamilton) byly vzorky nanесeny do jamek v takovém objemu, aby od každého vzorku bylo nanесeno stejné množství proteinů. Přístroj byl připojen ke zdroji napětí, při spuštění elektroforézy bylo napětí nastaveno na 70 V, při překročení barevného čela rozhraní mezi gely bylo napětí navýšeno na 100 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo dorazilo na konec gelu.

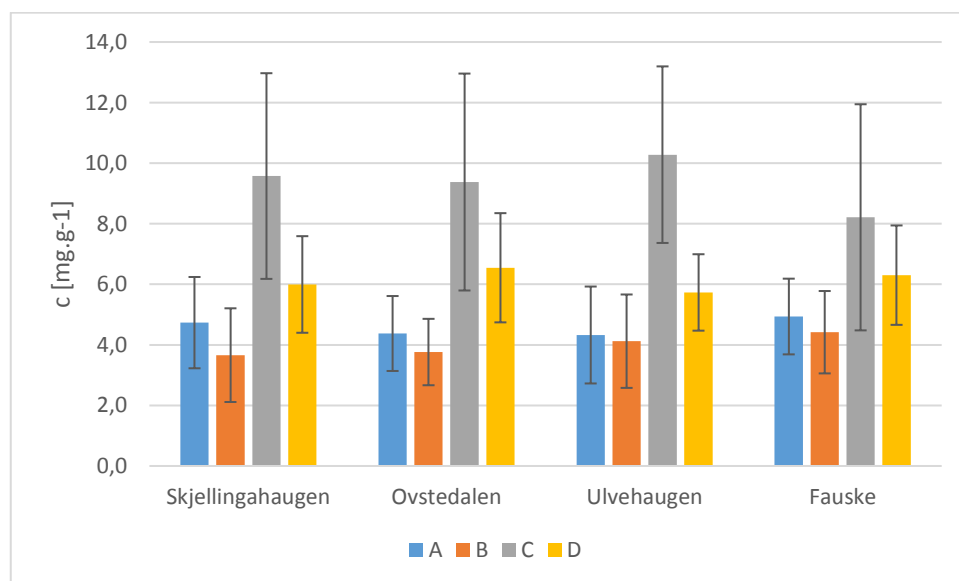
Poté byla provedena detekce aktivity šikimátdehydrogenázy. Na analytických vahách bylo naváženo 10,0 mg nitroblue tetrazolia, 0,5 mg fenazin metosulfátu, 52,0 mg šikimové kyseliny a 15,3 mg NADP. Bylo přidáno 40 ml 2-amino-2-methyl-1-propanolového pufru

a roztok byl doplněn dH<sub>2</sub>O na 100 ml. Gel byl umístěn na Petriho misku a byl k němu nalit barvicí roztok. Petriho miska byla ponechána reagovat cca 4 hodiny bez přístupu světla.

## 4. Výsledky

Vzorky rostlin kostřavy poskytnuté Botanickým ústavem AV ČR byly analyzovány, bylo stanoveno množství proteinů (obr. 9), aktivita Rubisco, aktivita šikimátdehydrogenázy a separovány její izoformy. Rostliny původně pocházely ze čtyř stanovišť v Norsku (Ulvhaugen, Skjellingahaugen, Fauske, Ovstedalen) lišících se nadmořskou výškou (od 346 do 1 208 m nad mořem), průměrnou roční teplotou (od 6,17 do 10,78 °C) a úhrnem ročních srážek (od 596 do 2 923 mm). Tyto rostliny byly pěstovány v klimatizovaných boxech označených A, B, C a D lišících se teplotou a vlhkostí. V každé skupině bylo analyzováno 5 až 10 vzorků.

Obr. 9 dokumentuje, že podmínky v klimatickém boxu měly výrazný dopad na množství rozpustných bílkovin v rostlině nezávisle na původním stanovišti rostliny. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny v boxu C, chladný a suchý.

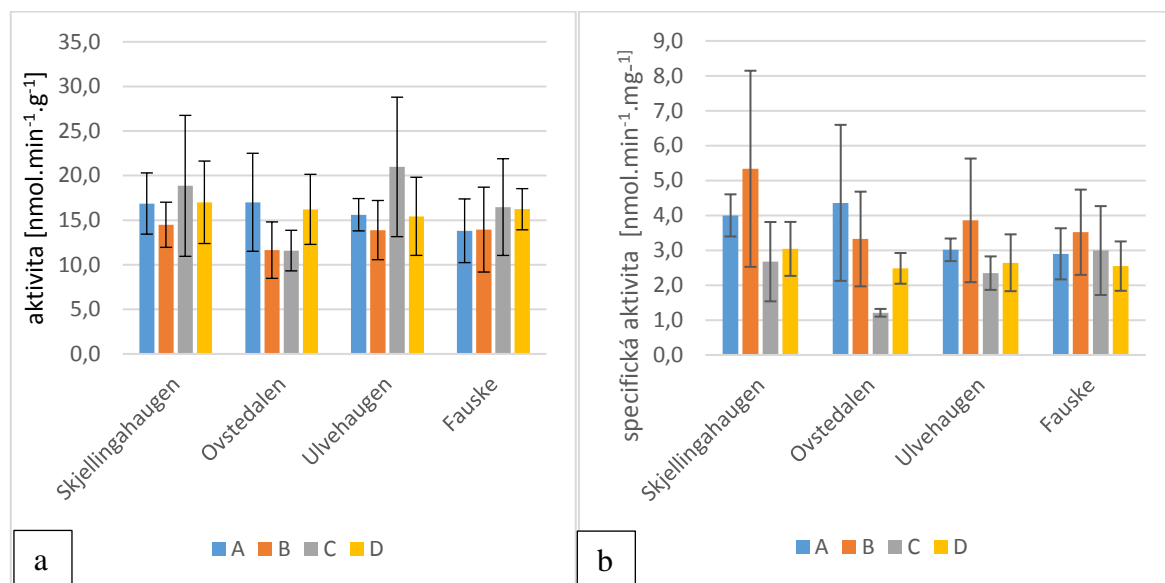


*Obrázek 9: Koncentrace rozpustných bílkovin vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti v rostlinách pocházejících ze čtyř lokalit v Norsku a pěstovaných v klimatizovaných boxech za různých podmínek teploty a vlhkosti*

### 4.1. Testování aktivity Rubisco v rostlinách kostřavy

Aktivita Rubisco byla měřena v extraktech z listů kostřavy, vztažená na čerstvou hmotnost (obr. 9a) a jako specifická aktivita, vztažená na 1 mg proteinu (obr. 9b). Z výsledků je

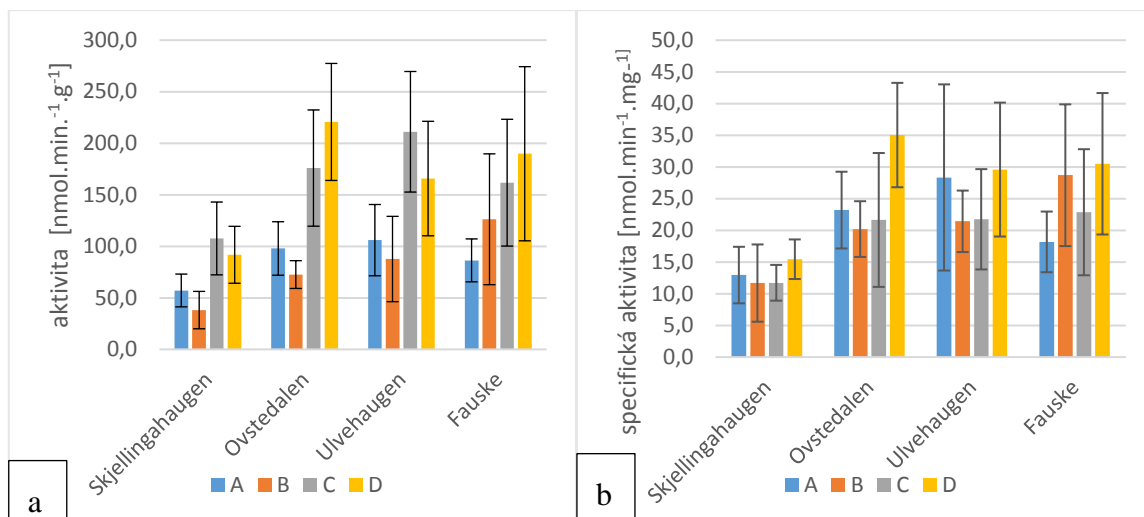
patrné, že aktivita Rubisco v rámci jedné skupiny vykazovala značnou variabilitu. Aktivita Rubisco vztažená na čerstvou hmotnost ukazovala některé rozdíly, které však nebyly statisticky významné. Při porovnání specifické aktivity byla její hodnota významně nižší u rostlin pocházejících z Ovstedalenu a pěstovaných v klimatickém boxu C, chladném a suchém.



Obrázek 10: Aktivita Rubisco v rostlinách pocházejících ze čtyř lokalit v Norsku a pěstovaných v klimatizovaných boxech za různých podmínek teploty a vlhkosti. a) Aktivita Rubisco vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti. b) Specifická aktivita Rubisco

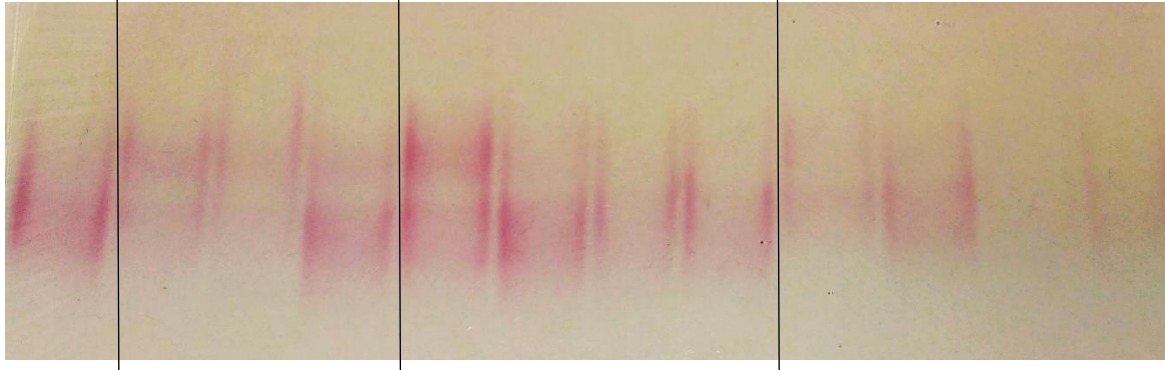
## 4.2. Testování aktivity šikimátdehydrogenázy v rostlinách košťavy

Dalším testovaným enzymem byla šikimátdehydrogenáza, která katalyzuje reakci šikimátové dráhy a jejími produkty jsou jednak aromatické aminokyseliny a jednak široká škála fenolických látek. Obrázky 10a,b zobrazují aktivitu šikimátdehydrogenázy vztaženou na čerstvou hmotnost (obr. 10a) a specifickou aktivitu šikimátdehydrogenázy (obr. 10b). Z výsledků je patrné, že vyšší aktivita šikimátdehydrogenázy byla zjištěna v rostlinách pěstovaných v klimatických boxech C (suchý a chladný) a D (suchý a teplý). Ukazuje se tu také vliv původního stanoviště. Nejnížší hodnoty měly rostliny pocházející ze Skjellingahaugenu, což jsou rostliny zvyklé na dostatek srážek a vysokou nadmořskou výšku, tedy nižší teplotu. Trend vyšší aktivity v suchých boxech je více patrný ve vyjádření aktivity vztažené na čerstvou hmotnost než v případě specifické aktivity.




Obrázek 11: Aktivita šikimátdehydrogenázy v rostlinách pocházejících ze čtyř lokalit v Norsku a pěstovaných v klimatizovaných boxech za různých podmínek teploty a vlhkosti. a) Aktivita šikimátdehydrogenázy vztahovaná na 1 g čerstvé hmotnosti. b) Specifická aktivita šikimátdehydrogenázy

Po elektroforetické separaci za nativních podmínek byla detekována aktivita šikimátdehydrogenázy v gelu. Obrázek 12 dokumentuje, že listy rostlin košťavy mohou obsahovat nejméně dvě izoformy šikimátdehydrogenázy lišící se elektroforetickou pohyblivostí. Zastoupení izoform v jednotlivých vzorcích se liší v závislosti na původním stanovišti i na podmínkách v klimatickém boxu. V rostlinách pocházejících z Ovstedalenu je vidět majoritní proužek šikimátdehydrogenázy s vyšší pohyblivostí, rostliny pěstované v boxu D mají navíc dobře patrný proužek s nižší pohyblivostí. Rostliny ze stanoviště Skjellingahaugenu měly nižší aktivitu šikimátdehydrogenázy než rostliny z ostatních stanovišť, jejich detekce v gelu je méně výrazná, majoritní je pravděpodobně izoforma s nižší pohyblivostí. V rostlinách pocházejících ze stanoviště Ulvehaugen jsou vidět obě izoformy v boxech A, B i D.

Fau.	Ulvehugen			Ovstedalen				Skjellingahaugen			
A	D	B	A	D	C	B	A	D	C	B	A
											

Obrázek 12a: Detekce aktivity šikimátdehydrogenázy v prvním gelu; A, B, C, D - klimatické boxy

Fausuke		
C	D	A
		

Obrázek 12b: Detekce aktivity šikimátdehydrogenázy v druhém gelu; C, D - klimatické boxy s rostlinami z Fausuke. Pro porovnání připojen výřez fotky prvního gelu.

## 5. Diskuze

Rostliny na rozdíl od živočichů nejsou schopny měnit své životní prostředí, musí se mu tedy přizpůsobit změnou svého metabolismu. V případě méně příznivých nebo nepříznivých podmínek je metabolismus více úsporný, snižuje fotosyntézu a redukuje růst rostliny. Některé typy stresu naopak stimulují syntézu specifických látek, které pomáhají rostlinným buňkám překonat období stresu. Například v průběhu nedostatku vody se v rostlinách syntetizují malé osmoticky aktivní molekuly, které zadržují vodu v buňce nebo při napadení patogenem rostliny syntetizují specifické obranné látky.



V této práci jsme analyzovali zajímavé vzorky listů kostřavy poskytnuté z Botanického ústavu AV ČR. Genetičtí jedinci odebraní na stanovištích v Norsku lišících se nadmořskou výškou, průměrnou roční teplotou a množstvím srážek byly pěstovány v klimatizovaných boxech lišících se teplotou a vlhkostí. Pro analýzu takto získaných vzorků listů jsme zvolili dva parametry – aktivitu klíčového fotosyntetického enzymu ribulosa-bisfosfátkarboxylázy/oxygenázy (Rubisco) a enzymu šikimátové dráhy šikimátdehydrogenázu.

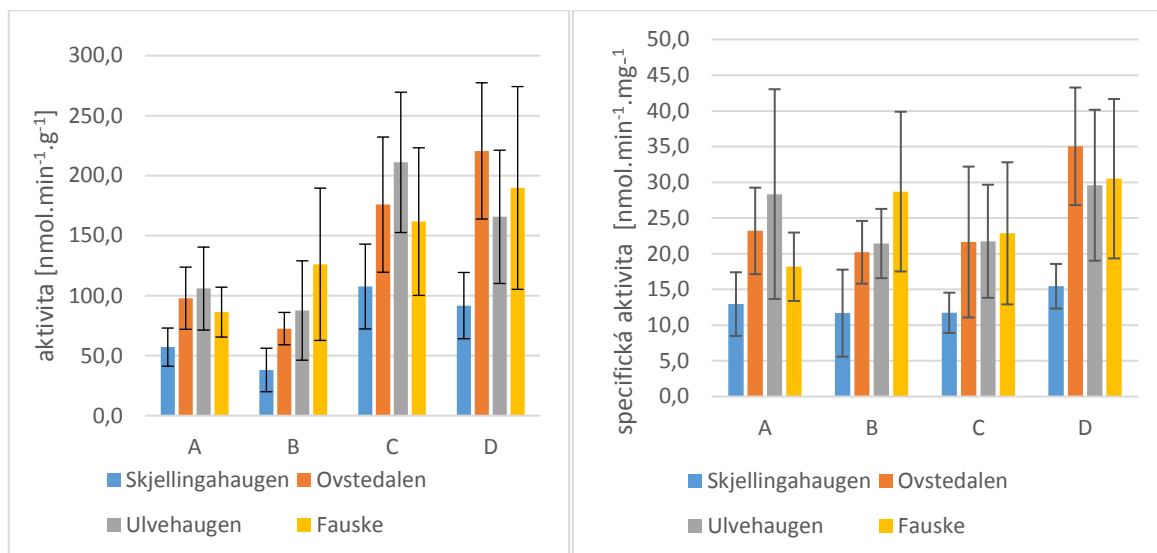
Rubisco je enzymem s vysokou molekulovou hmotností a nízkým číslem přeměny. Vyskytuje se v chloroplastech ve velkém množství a patří k nejhojnějším proteinům vůbec. Aktivita tohoto enzymu je citlivě regulována, jak syntézou tak degradací [46]. Protein Rubisco může za určitých okolností být degradován a sloužit rostlině jako zdroj aminokyselin. Aminokyseliny se tak dostávají z plně vyvinutých listů do mladých listů nebo dozrávajících plodů. Role degradace Rubisco je rovněž při senescenci, kdy aminokyseliny přecházejí do zásobních orgánů, nebo při nedostatku anorganického dusíku v půdě. Další regulační úroveň je aktivace pomocí Rubisco aktivázy. Tato aktivace zaručuje, aby enzym Rubisco byl funkční pouze, je-li aktivní světelná část fotosyntézy a rostlina má k dispozici dostatek ATP a NADPH. Naše výsledky dokumentují, že aktivita Rubisco nevykazovala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stanovišti v Norsku ani mezi odlišnými podmínkami pěstování v klimatizačních boxech. Je třeba dodat, že testována byla pouze karboxylázová aktivita, rostliny by se mohly lišit úrovní fotorespirace, za kterou je odpovědná oxygenázová aktivita Rubisco [47].

Jelikož je Rubisco jedním z nejdůležitějších enzymů fotosyntézy, její aktivita odráží, v jakém je stavu rostlina a její metabolismus. Toho jsme chtěli dosáhnout během pokusu, ale ukázalo se, že ze statistického hlediska nebylo možné nalézt obecný rys pro její aktivitu.

Šikimátdehydrogenáza je jedním z enzymů šikimátové dráhy vedoucí k biosyntéze aromatických aminokyselin nacházející se v chloroplastech [1, 24]. Fenylalanin, popřípadě tyrosin neslouží jen ke stavbě proteinů, ale jsou substrátem pro širokou škálu fenolických látek, jako jsou fenolické kyseliny flavonoidy, kumariny, stilbeny, anthokyany, lignany, ligniny a taniny. Tyto látky se často řadí mezi sekundární rostlinné metabolity, které plní v rostlinách řadu funkcí, často poskytují výhody za stresových podmínek. Mohou rostlinu chránit před patogenními mikroorganismy, před býložravci. Důležitá je také ochrana před UV zářením. Tyto látky mají též významné antioxidační vlastnosti a pomáhají tak

roślinám vyrovnávat se s oxidativním stresem, který provází téměř všechny typy stresu. Veškeré biosyntetické produkty vycházející z této dráhy tvoří 50 % sušiny [24].

Enzym, který propojuje metabolismus aromatických aminokyselin a fenolických látek, je fenylalaninamoniumlyáza. Bylo zjištěno, že mnoho typů stresu vede ke zvýšené aktivitě tohoto enzymu [1]. V naší práci jsme zjistili, že také aktivita šikimátdehydrogenázy může souviset se stresem (obr. 11). Ukázalo se, že rostliny pěstované v boxu D (suchý a teplý), vykazují nejvyšší aktivitu šikimátdehydrogenázy. Vyšší aktivitu měly též rostliny v boxu C (suchý a chladný) než v boxech A a B, jejichž prostředí bylo vlhké. Zdá se tedy, že touto drahou jsou syntetizovány také látky, pomocí kterých se rostlina vyrovnává s nedostatkem vody a zároveň se může vyrovnávat s oxidativním stresem. Podobné závěry bylo možno vyvodit také z pokusů prováděných v Ústavu experimentální botaniky AV ČR se shodným experimentálním materiálem, kdy ve vzorcích kostřavy pěstovaných v boxech za podmínek sucha byla nalezena zvýšená aktivita antioxidačních enzymů včetně superoxiddismutázy a zvýšená hladina fenolických látek. Také kombinace sucha a tepla je více rizikovým faktorem než sucho a chlad (H. Synková, osobní sdělení). Ukazuje se, že není patrná souvislost mezi původním stanovištěm, alpínskou nebo boreální oblastí, nebo malým a velkým ročním úhrnem srážek. Nejnižší aktivita šikimátdehydrogenázy byla naměřena ze stanoviště Skjellingahaugen s nadmořskou výškou 1 088 m nad mořem a vysokým úhrnem srážek (2 725 mm). Tyto rostliny mají pravděpodobně již syntetizované značné množství fenolických látek a netrpí nedostatkem vody. Jak bude fungovat metabolismus těchto rostlin pěstovaných v klimatizovaných boxech bude předmětem dalších výzkumů. Na druhou stranu se ukazuje, že izoenzymové složení šikimátdehydrogenázy na původních stanovištích závisí, rovněž tak na pěstebních podmínkách v klimatizovaných boxech (obr. 13).



Obrázek 13: Aktivita šikimátdehydrogenázy v rostlinách pocházejících ze čtyř lokalit v Norsku a pěstovaných v klimatizovaných boxech za různých podmínek teploty a vlhkosti. a) Aktivita šikimátdehydrogenázy vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti. b) Specifická aktivita šikimátdehydrogenázy

Z výsledků vyplývá, že *Festuca rubra* obsahuje dvě izoformy šikimátdehydrogenázy lišící se elektroforetickou pohyblivostí. Podobný výsledek byl zjištěn i u jiných druhů rostlin. V semenech, klíčcích i kořenech hrachu byly nalezeny dva izoenzymy se stejnou molekulovou hmotností ale odlišným elektrickým nábojem a Michaelisovou konstantou [48]. Také byly popsány v semenech pepře (*Capsicum annuum*) [49] či kultivarech citrusů [50].

## 6. Závěr

V extraktech z listů kostřavy (*Festuca rubra* L.) pěstovaných za odlišných podmínek vlhkosti a teploty v klimatizovaných boxech byla změřena aktivita klíčového fotosyntetického enzymu Rubisco, aktivita enzymu šikimátové dráhy šikimátdehydrogenázy a množství rozpustných proteinů.

1. Mezi testovanými skupinami rostlin nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v aktivitě Rubisco vztažené na čerstvou hmotnost ani ve specifické aktivitě.
2. Aktivita šikimátdehydrogenázy byla vyšší v extraktech rostlin pěstovaných v suchém a teplém boxu než v boxu suchém a chladném. Nižší aktivita šikimátdehydrogenázy byla zjištěna v boxech vlhkých, a to jak teplém, tak chladném.

3. Šikimátdehydrogenáza se v rostlinách košťavy vyskytuje nejméně ve dvou izoformách lišících se elektroforetickou pohyblivostí, jejich výskyt závisí na původním stanovišti i na pěstebních podmínkách.

## 7. Citace

1. **Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL.** 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons.
2. **Nelson GC, van der Mensbrugghe D, Ahammad H, Blanc E,** et al. 2014. Agriculture and climate change in global scenarios: why don't the models agree. *Agric. Econ.* **45**: 85–101.
3. **Praba ML, Cairns JE, Babu RC, Lafitte HR.** 2009. Identification of Physiological Traits Underlying Cultivar Differences in Drought Tolerance in Rice and Wheat. *J. Agron. Crop Sci.* **195**: 30–46.
4. **Hayes M, Svoboda M, Wall N, Widhalm M.** 2011. The Lincoln Declaration on Drought Indices. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* **92**: 485–8.
5. **Potopova V, Stepanek P, Farda A, Turkott L,** et al. 2016. Drought Stress Impact on Vegetable Crop Yields in the Elbe River Lowland Between 1961 and 2014. *Cuad. Investig. Geogr.* **42**: 127–43.
6. **Ings J, Mur LAJ, Robson PRH, Bosch M.** 2013. Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*. *Front. Plant Sci.* **4**
7. **Anithakumari AM, Nataraja KN, Visser RGF, van der Linden CG.** 2012. Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Mol. Breed.* **30**: 1413–29.
8. **Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF,** et al. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.* **6**: 2026–32.
9. **Barr HD, Weatherley PE.** 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves.
10. **Nezhadahmadi A, Prodhan ZH, Faruq G.** 2013. Drought Tolerance in Wheat. *Sci. World J.* **2013**
11. **Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D,** et al. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* **29**: 185–212.
12. **Ashraf M, Harris PJC.** 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* **51**: 163–90.
13. **Ng LM, Melcher K, Teh BT, Xu HE.** 2014. Absciscic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**: 567–84.
14. **Kim T-H.** 2014. Mechanism of ABA signal transduction: Agricultural highlights for improving drought tolerance. *J. Plant Biol.* **57**: 1–8.
15. **Avramova V, Abdelgawad H, Zhang Z, Fotschki B,** et al. 2015. Drought Induces Distinct Growth Response, Protection, and Recovery Mechanisms in the Maize Leaf Growth Zone. *Plant Physiol.* **169**: 1382–+.

16. **Jaleel CA, Gopi R, Sanklar B, Gomathinayagam M**, et al. 2008. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *C. R. Biol.* **331**: 42–7.
17. **Batra NG, Sharma V, Kumari N**. 2014. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and thylakoid membrane proteins of *Vigna radiata*. *J. Plant Interact.* **9**: 712–21.
18. **Yadav SK**. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **30**: 515–27.
19. **Hu Z, Liu A, Bi A, Amombo E**, et al. 2017. Identification of differentially expressed proteins in bermudagrass response to cold stress in the presence of ethylene. *Environ. Exp. Bot.* **139**: 67–78.
20. **Voet D, Voet JG**. 2010. *Biochemistry, 4th Edition*. John Wiley & Sons.
21. **Siddiqui MH, Al-Khaishany MY, Al-Qutami MA, Al-Whaibi MH**, et al. 2015. Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. *Saudi J. Biol. Sci.* **22**: 656–63.
22. **Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T**, et al. 2013. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* **64**: 3201–12.
23. **Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R**. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* **90**: 856–67.
24. **Heldt H-W, Piechulla B**. 2010. *Plant Biochemistry*. Academic Press.
25. **Gill SS, Tuteja N**. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem. PPB* **48**: 909–30.
26. **Harb A, Awad D, Samarah N**. 2015. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *J. Plant Interact.* **10**: 109–16.
27. **Chugh V, Kaur N, Gupta AK**. 2011. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian J. Biochem. Biophys.* **48**: 47–53.
28. **Mittler R**. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405–10.
29. **Voeikov VL**. 2006. Reactive oxygen species-(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J. Altern. Complement. Med.* **12**: 111–8.
30. **Hu Y, Wang B, Hu T, Chen H**, et al. 2015. Combined action of an antioxidant defence system and osmolytes on drought tolerance and post-drought recovery of *Phoebe zhennan* S. Lee saplings. *Acta Physiol. Plant.* **37**: 84.

31. **Chakraborty U, Pradhan B.** 2012. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Braz. J. Plant Physiol.* **24**: 117–30.
32. **Akram NA, Waseem M, Ameen R, Ashraf M.** 2016. Trehalose pretreatment induces drought tolerance in radish (*Raphanus sativus* L.) plants: some key physio-biochemical traits. *Acta Physiol. Plant.* **38**: 3.
33. **Krasensky J, Jonak C.** 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **63**: 1593–608.
34. **Bouche N, Fromm H.** 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* **9**: 110–5.
35. **Giri J.** 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1746–51.
36. **Szabados L, Savoure A.** 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**: 89–97.
37. **Verslues PE, Sharma S.** 2010. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* **8**
38. **Veeranagamallaiah G, Prasanthi J, Reddy KE, Pandurangaiah M, et al.** 2011. Group 1 and 2 LEA protein expression correlates with a decrease in water stress induced protein aggregation in horsegram during germination and seedling growth. *J. Plant Physiol.* **168**: 671–7.
39. **Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT.** 2014. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Front. Plant Sci.* **5**
40. **Vierling E.** 1991. The Roles of Heat-Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 579–620.
41. **Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**: 244–52.
42. **Carmo-Silva AE, Gore MA, Andrade-Sanchez P, French AN, et al.** 2012. Decreased CO<sub>2</sub> availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environ. Exp. Bot.* **83**: 1–11.
43. **Veen HV, Vashisht D, Akman M, Girke T, et al.** 2016. Transcriptomes of eight *Arabidopsis thaliana* accessions reveal core conserved, genotype- and organ-specific responses to flooding stress. *Plant Physiol.*
44. **Graman J, Čurn V.** 1998. *Šlechtění rostlin*. České Budějovice.

45. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–5.
46. **Feller U, Anders I, Mae T.** 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.* **59**: 1615–24.
47. **Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM.** 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
48. **Rothe GM.** 1974. Intracellular compartmentation and regulation of two shikimate dehydrogenase isoenzymes in *Pisum sativum*. *Z. Für Pflanzenphysiol.* **74**: 152–9.
49. **Diaz J, Merino F.** 1997. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Purification and properties. *Physiol. Plant.* **100**: 147–52.
50. **King BJ, Lee LS, Scott PT.** 1996. Identification of triploid Citrus by isozyme analysis. *Euphytica* **90**: 223–31.



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka